ULTRAESTRUCTURA E HISTOQUIMICA DE DOS TIPOS DE GLANDULAS MUCOSAS DE LA PIEL DE CRYPTOBATRACHUS (Amphibia, Anura)

Por

Gloria R. de Pérez *
Pedro M. Ruiz G. **

RESUMEN

Se estudió la piel de la región dorsal del tronco de *Cryptobatrachus* (Amphibia, Anura). Se caracterizó al microscopio de luz, al microscopio electrónico y con métodos histoquímicos, llegando a la conclusión de la presencia de dos tipos de glándulas mucosas (G1 y G2), bien diferenciadas histológica e histoquímicamente. Se describe por primera vez una de ellas, las glándulas mucosas G2, estructuras especializadas que contribuyen posiblemente con las secreciones para la fijación de los huevos y embriones en desarrollo de las ranas que incuban sus crías en el dorso.

SUMARY

The skin of the middorsal region of the trunk of Cryptobatrachus is studied here. The skin is characterized by light microscopy electron microscopy (TEM), and by histochemical test. These means support a conclusion that two types of mucous glands are present. These are termed here G1 and G2. The former is common among frogs but the latter (G2) is described for the first time. G2 mucous glands possibly contribute secretions used in holding the eggs and developing embryos on the skin of the dorsum in those frogs which incubate their young on the back of the females.

---

* Profesora Asistente. Departamento de Biología Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

** Profesor Asociado. Instituto de Ciencias Naturales Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

INTRODUCCION

Según el modo más generalizado de reproducción de los Anura, la hembra deposita los huevos en el agua. Sin embargo, otras formas de reproducción han sido descritas por varios autores a manera de estrategias adaptativas en una variedad de especies. (CRUMP, 1974, DUELLMAN, 1978). En hílidos de las subfamilias Amphignathodontinae y Hemiphractinae, las hembras llevan los huevos y las formas embrionarias en desarrollo en el dorso, a veces dentro de bolsas, de pliegues, de depresiones o simplemente sobre la piel, donde tiene lugar el desarrollo de la cría (TRUEB, 1974). Como un rasgo característico de la mayoría de las especies de los géneros de estas subfamilias, la larva presenta un tipo de branquia acampanulada (TRUEB, 1974). El número de huevos por postura es pequeño pero en cambio poseen una apreciable cantidad de vitelo que provee el alimento suficiente (DUELLMAN, 1978). Observaciones realizadas en el tegumento dorsal de hembras de *Stephania*, sugieren la formación de una doble membrana que podría estar constituida por secreciones de la piel y la membrana de los huevos, proporcionando así un mecanismo de adhesión de estos últimos (RIVERO, 1970). En el estudio sobre la histología de la piel de hembras de *Cryptobatrachus, Stephania* y *Hemiphractus* durante la época reproductiva (DEL PINO, 1980) sugiere la presencia de ciertas características, que permiten suponer una especialización al modo particular de desarrollo. Entre estas características se señalan: una reducción en el número de glándulas venenosas, una mayor vascularización y un aumento en el número y volumen de las glándulas mucosas. Según la misma autora estas últimas serían responsables de la secreción de la matriz a la cual se fijan las envolturas del embrión y el tegumento materno. Como se sabe, la función principal de las glándulas mucosas en los Anura es la de secretar mucosubstancias encargadas de mantener la humedad de la piel.

El presente trabajo constituye un estudio preliminar sobre la estructura, ultraestructura e histoquímica de las glándulas mucosas de la piel de hembras de *Cryptobatrachus,* como una contribución al conocimiento del papel que pueda tener la piel en la reproducción de esta especie.

MATERIALES Y METODOS

Hembras de *Cryptobatrachus,* de la localidad de Sasaima, Departamento de Cundinamarca, Colombia, sexualmente maduras (sin embriones en el dorso) fueron anestesiadas con "Tricaine Methane Sulfonate" MS Sandoz y fijadas por perfusión intracardíaca con una solución de 2.5% glutaraldehído en tampón fosfato 0.1 M. pH 7.4. Inmediatamente, segmentos de piel de la región dorsal fueron removidos y sumergidos en el mismo fijador durante 4 a 6 horas.

Los segmentos fueron guardados durante 14 horas en tampón fosfato 0.1 M. postfijados 1 hora en tetróxido de osmio al 2%, deshidratados en etanol y embebidos en una mezcla de Epon-Araldita. El estudio histológico se realizó a partir de secciones semifinas transversales y paralelas a la superficie, obtenidas en un ultramicrótomo Reichert, y coloreadas con azul de toluidina. Cortes ultrafinos correspondientes fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo y examinados en un microscopio electrónico Siemens Elmiskop IA, o un Jeol 100 CX. Algunas secciones fueron colocadas sobre rejillas cubiertas con una membrana de Formwar. El estudio histoquímico de las glándulas mucosas, se realizó a partir de secciones semifinas. En la identificación de mucopolisacáridos se utilizaron las coloraciones de Azul de Alcian, Hierro coloidal y Acido Periódico de Schiff (P. A. S.). Previo a las coloraciones, el medio de inclusión fue removido con metóxido de sodio (MAYOR *et al.* 1961).

RESULTADOS

OBSERVACIONES AL MICROSCOPIO OPTICO

Histológicamente la piel dorsal de *Cryptobatrachus* es similar a la descrita para los Anura. La epidermis está compuesta por un epitelio estratificado plano de 5 a 6 capas de células y una delgada capa córnea. En ninguno de los ejemplares estudiados se observó la presencia de una matriz adicional en la superficie del tegumento. Las glándulas mucosas y granulosas están alojadas en el estrato esponjoso de la dermis; el estrato compacto es particularmente denso. Subyacente a la epidermis, y rodeando las glándulas se encuentra una capa de melanóforos. Regularmente, haces de fibras colágenas ascendentes perpendiculares a la superficie, atraviesan la dermis. Vasos sanguíneos y nervios cruzan la dermis en varias direcciones. En coincidencia con la apreciación sobre Hylidae (DUELLMAN, 1970) *Cryptobatrachus* presenta abundantes glándulas mucosas y un escaso número de glándulas venenosas. Un examen histológico detenido, muestra que la piel de esta especie tiene 3 tipos de glándulas: glándulas venenosas, glándulas mucosas típicas aquí denominadas G1, constituidas por una envoltura de células mioepiteliales que rodea una capa de células columnares secretoras, y un tercer tipo de estructura glandular aquí denominada G2, de la cual no se tiene información, también en forma de alvéolo. (Fig. 1). Una capa de células mioepiteliales periféricas rodea al conjunto de células epiteliales planas secretoras. En corte transversal se observa que estas últimas ocupan solo los dos tercios profundos de la glándula visualizándose un material con apariencia espumosa, metacromática cuando se colorea con azul de toluidina. A causa de la altura relativa de las células del epitelio secretor, estas rodean una cavidad de mayor volumen si se compara con la cavidad de las glándulas G1. Con frecuencia se observa en estas glándulas

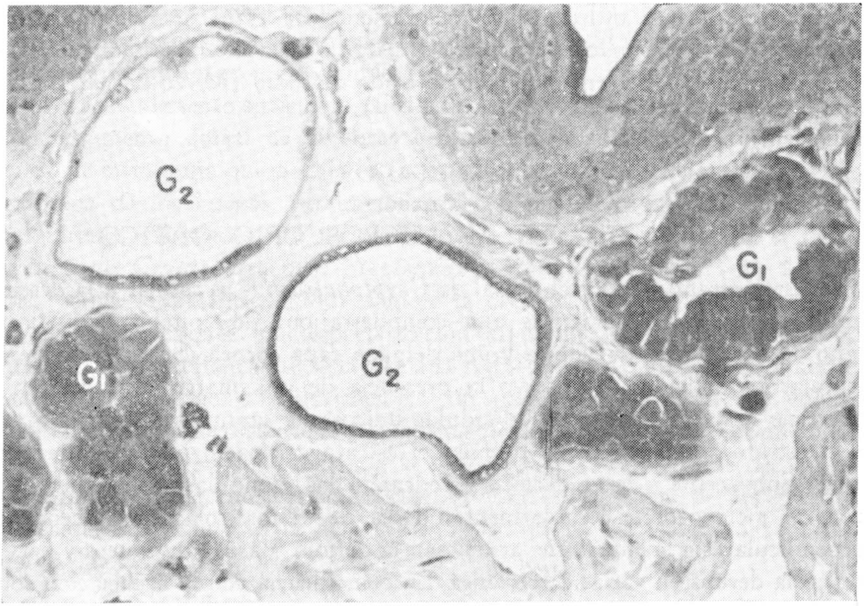

FIGURA 1. Sección semifina de piel de *Cryptobatrachus* con glándulas mucosas G1 y G2. Se observa la delgada capa muscular que rodea las glándulas. Nótense las diferencias de altura, aspecto general del epitelio secretor y del volumen de la luz de los dos tipos de glándulas. Coloración con azul de toluidina x 452.

que el epitelio se desprende de las células mioepiteliales. Se desconoce el signifificado de esta característica. Aunque podría ser un artefacto, no se descarta que tenga relación con la forma de secreción de la glándula, aspecto que no se estudió en este trabajo.

Observaciones al microscopio electrónico.

Las glándulas mucosas Gl, como ya se anotó, están constituidas por una envoltura de células mioepiteliales, con una relativa cantidad de glicógeno, separadas del tejido conjuntivo por la lámina basal. Las células del epitelio secretor en su mayoría columnares están en contacto con las células mioepiteliales por medio de desmosomas. En células en actividad de síntesis, el retículo endoplasmático rugoso (RER) está altamente desarrollado; las cisternas muestran una gran distensión como resultado del almacenamiento del producto de secreción, y rodean un sistema laberíntico de citoplasma. (Fig. 2). El aparato de Golgi bien desarrollado, está compuesto por complejos vesiculosaculares en posición juxtanuclear. Las mitocondrias son relativamente escasas. Gránulos de secreción de diferentes tamaños, y densidad homogénea se concentran en el polo apical de la célula desde donde son secretados a la luz de la glándula y de allí transportados hacia la superficie (Fig. 3). Uniones de tipo ocluyente son visibles en el borde apical de las membranas laterales. Microvellosidades se proyectan a la luz de la glándula. En la región basal la membrana celular presenta numerosas interdigitaciones en contacto con las células mioepiteliales. El estudio de la ultraestructura de la glándula G2 revela estar compuesta como la anterior por una capa de células mioepiteliales unidas entre sí por desmosomas. Las células epiteliales que forman el revestimiento interno del tercio superior de la glándula son planas con muy poco citoplasma y abundantes mitocondrias. El RER, poco desarrollado, consiste de cisternas cortas (Fig. 4). Las células epiteliales localizadas hacia los dos tercios inferiores de la glándula, también planas presentan complejos de Golgi, RER bien desarrollado que ocupa junto con los gránulos de secreción la mayor parte del volumen celular. Entre las cisternas del retículo se observa un reducido número de mitocondrias. En los dos casos las células epiteliales se unen a la envoltura mioepitelial por medio de desmosomas. La secreción almacenada en los gránulos, a diferencia de las células de la glándula Gl tiene una apariencia muy finamente fibrilar, con una distribución regular en distintas direcciones espaciales. En los gránulos localizados en la región apical de las células el material de secreción se acumula hacia la parte externa, formando a este nivel en algunas regiones, acúmulos densos de aspecto fibrilar irregular, en forma, orientación y espesor. (Figs. 5 y 6). En estas glándulas, el epitelio se desprende en algunas regiones de la capa de células mioepiteliales.

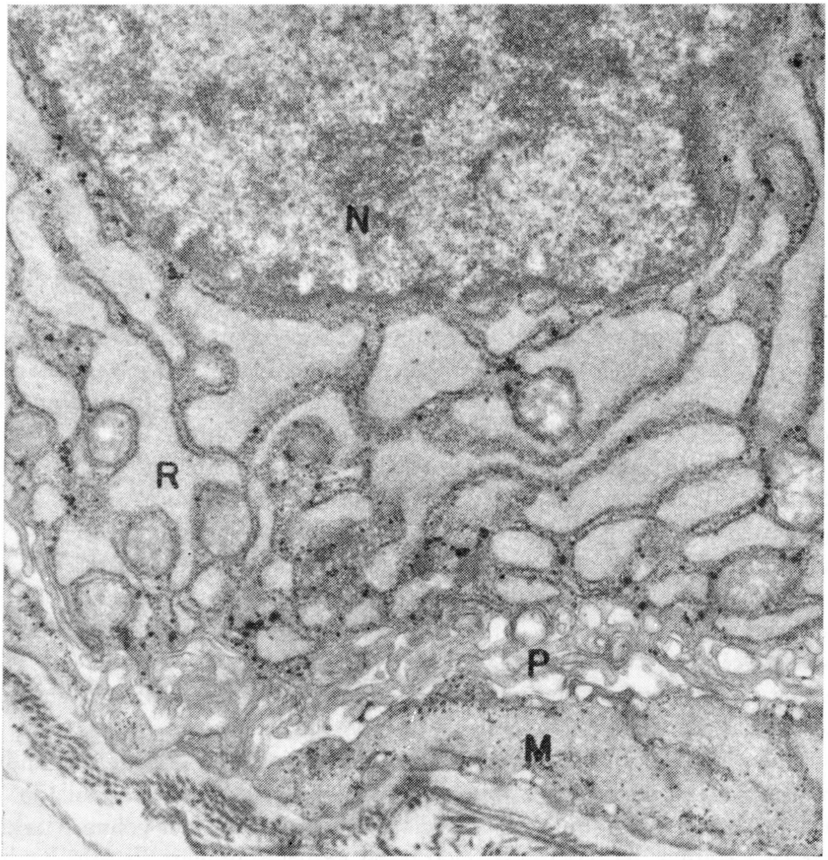

FIGURA 2. Región basal de una célula de la glándula mucosa típica G1. Nótese el gran desarrollo del RER (R), la presencia de algunas mitocondrias, y las interdigitaciones de la membrana celular en contacto con las células mioepiteliales (M). x 1800.

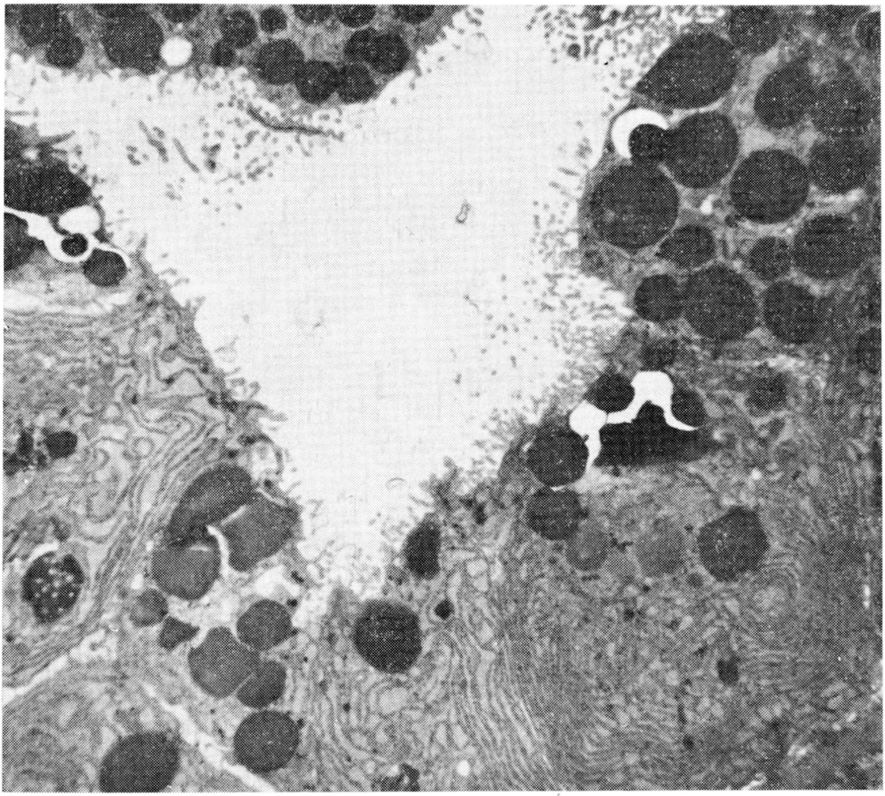

FIGURA 3. Borde apical de células secretoras alrededor de la luz de la glándula G1. Se observan los gránulos densos y esféricos, y el desarrollo del retículo endoplasmático rugoso. x 7200.

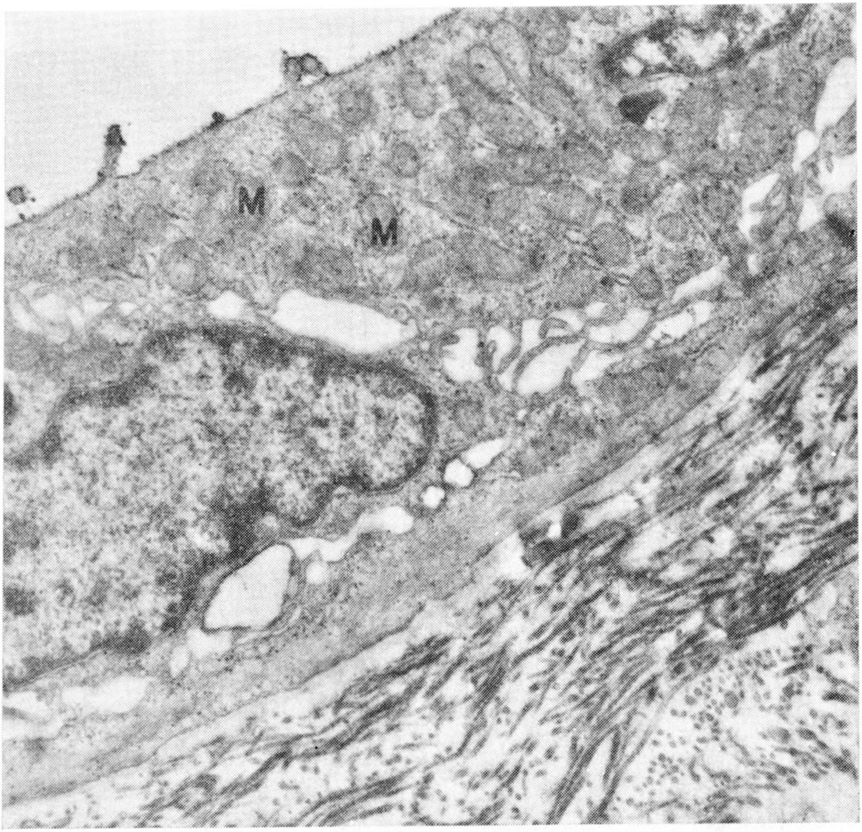

FIGURA 4. Aspecto de las células epiteliales del tercio superior de la glándula mucosa G2. Nótese la unión desmosómica de las células mioepiteliales. Las células epiteliales presentan interdigitaciones en contacto con las células musculares. Obsérve la abundancia de mitocondrias (M) en toda célula y la presencia de cisternas cortas de RER. x 18000.

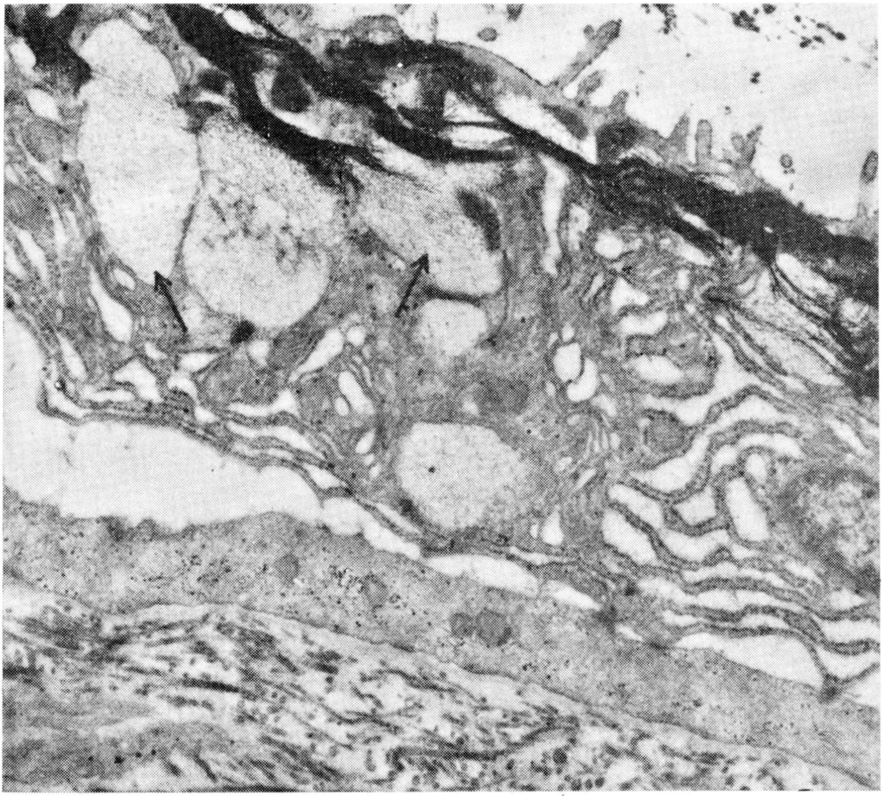

FIGURA 5. Aspecto de una célula secretora de la glándula mucosa G2. Se observan cisternas alargadas de RER y complejos de Golgi. Los gránulos de secreción (flechas) con material finamente fibrilar y en la región más externa acúmulos densos de material. x 1800.

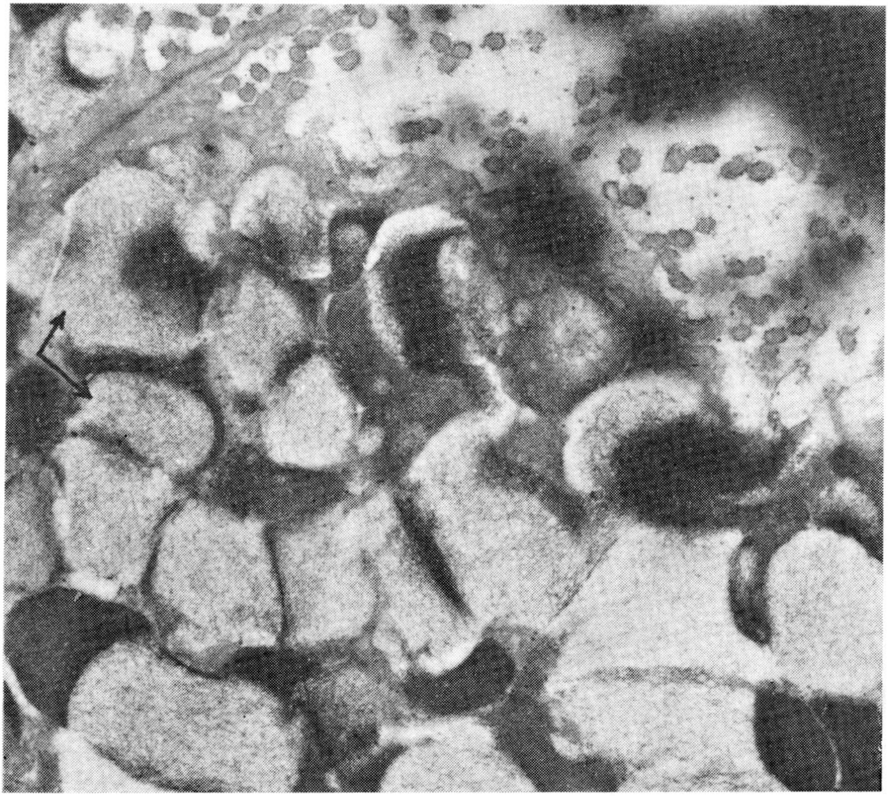

FIGURA 6. Región apical de célula secretora de la glándula G2 prácticamente ocupada por los gránulos de secreción de aspecto irregular. x 18000.

Resultados histoquímicos.

Los resultados histoquímicos obtenidos muestran una reacción diferente de los dos tipos de glándulas mucosas G1 y G2 a las coloraciones utilizadas en la identificación de mucosubstancias. En las glándulas mucosas típicas (G1), los gránulos de algunas células mostraron una reacción PAS positiva, indicando la presencia de glicoproteínas neutras. Las reacciones con Azul de Alcian (pH 2.6) y con hierro coloidal fueron negativas en todas las células de este tipo de glándula.

En las glándulas mucosas G2 en contraste con las glándulas G1 los gránulos fueron PAS negativos; y aún más las reacciones con Azul de Alcian (pH 2.6) y con hierro coloidal fueron intensamente positivas, revelando en su constitución la presencia de mucopolisacáridos ácidos. Esta reacción histoquímica fue similar en todas las glándulas mucosas G2.

DISCUSION

Como en otros Hylidae la piel de la especie de *Cryptobatrachus* aquí estudiada, se caracteriza por la abundancia de glándulas mucosas y un reducido número de glándulas venenosas. De acuerdo con los resultados obtenidos las glándulas mucosas son de dos clases: G1 y G2, bien diferenciadas en su estructura, ultraestructura y reacciones histoquímicas.

Desde las primeras descripciones sobre el tegumento de los Anura (MUSHE, 1909; DAWSON, 1920; NOBLE y NOBLE, 1944), la morfología e histoquímica de las glándulas mucosas han sido objeto de varios trabajos, y si bien algunos autores han señalado modificaciones como resultado de adaptaciones locales (NOBLE, 1954) y diferencias en el tamaño de las mismas (LE QUANG TRONG, 1971) la estructura es, de manera general, muy semejante, constituida por células que pueden variar entre columnares y cúbicas, con una cavidad relativamente pequeña. La diferencia de altura de las células parece tener relación con el ciclo de síntesis de la secreción. (DOMÍNGUEZ *et al.* 1981). De las glándulas mucosas encontradas en *Cryptobatrachus* el tipo G1 corresponde a las glándulas comúnmente descritas para la región dorsal del tronco. DEL PINO (1980) en su trabajo acerca del mecanismo de fijación de los huevos y embriones al tegumento de hembras de *S. scalae, C. furhmanni,* y cinco especies de *Hemiphractus,* otorga una importancia significativa en este proceso a la matriz secretada por las glándulas mucosas, la cual estaría formada por capas de células epiteliales muertas y material PAS positivo.

En la especie de *Cryptobatrachus* aquí estudiada, solo en algunas células de las glándulas G1 se observaron gránulos PAS positivos.

La ausencia en ellas de una reacción positiva con hierro coloidal y Azul de Alcian, permite suponer que se trata de mucopolisacáridos neutros. Sin embargo la función que estos mucopolisacáridos puedan desempeñar en la adhesión de la postura a la piel no se ha demostrado.

La secreción de glicoproteínas neutras parece corresponder al tipo de secreción de las glándulas mucosas de la mayor parte de las especies de Anura (DOMÍNGUEZ *et al.*, 1981). Estudios histoquímicos de las glándulas mucosas de varias especies de *Phrynobatrachus* (LE QUANG TRONG, 1971) y de *Rana ridibunda* (DOMÍNGUEZ *et al.*, 1981) especies en las cuales el desarrollo embrionario tiene lugar sin la intervención del tegumento materno, han demostrado igualmente la presencia de dichas sustancias en los gránulos de algunas células. Observaciones de la ultraestructura de las glándulas mucosas de *Rana ridibunda* comparadas con los resultados histoquímicos sugieren una correlación entre las diferencias de densidad de los gránulos y la reacción histoquímica y estos a su vez con las etapas de maduración de los gránulos, observándose en una misma glándula o en glándulas diferentes, células sin ninguna reacción, células PAS positivas y células cuya reacción indicó la presencia de mucinas siálicas y sulfatadas, reacciones que tendrían una correspondencia con fases sucesivas del ciclo de síntesis y maduración de los gránulos. Nuestros resultados coinciden solo parcialmente en cuanto se refiere a las glándulas G1 ya que como se mencionó más arriba, algunas células fueron PAS positivas en tanto que en la mayoría de las células la reacción fue negativa con las técnicas utilizadas. Ninguna glándula G1 reaccionó positivamente en la identificación de mucopolisacáridos ácidos. Es posible que las glándulas G1 de *Cryptobatrachus* solo sinteticen glicoproteínas neutras, o bien que las técnicas empleadas no hayan permitido la identificación de otras mucosubstancias. Una explicación satisfactoria a este punto se tendrá quizás cuando se realice una investigación sistematizada de la piel de esta especie.

El conjunto de características señaladas en los resultados, muestra que las glándulas mucosas que hemos denominado G1 y G2 son efectivamente estructuras diferentes, más que etapas del ciclo de secreción de la glándula G1.

En las glándulas mucosas G2, las reacciones de metacromasia y alcianofilia del material espumoso secretado por las células planas, son reacciones constantes en las glándulas de este tipo.

La ultraestructura de los gránulos y en especial el aspecto fibrilar fino de su contenido es comparable a la secreción mucilaginosa de ciertas células vegetales, por ejemplo de las de la cofia de la raíz de algunas plantas (GIGOT y PORTE, 1971). Este hecho contrasta con las imágenes de la estructura fina de los gránulos de secreción de las especies de Anura estudiadas en las cuales estos tienen la apariencia de cuerpos densos, homogéneos como en el caso de las glándulas G1, y que son características de las células animales que sintetizan esta clase de productos. Los dos tipos de glándulas se observaron en secreciones de piel dorsal de un ejemplar macho, lo que indica que son características de la especie.

El significado de las glándulas mucosas G1 y G2 como adaptación específica a la forma de reproducción de *Cryptobatrachus* se desconoce aún. Aunque no se descarta la importancia de las secreciones de estas glándulas en la fijación de los embriones al tegumento materno, sin embargo, una conclusión en este sentido requiere el estudio de la piel de hembras en diferentes etapas de madurez sexual, y la relación entre el tipo de secreción y las envolturas de los óvulos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al personal científico del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad Louis Pasteur de Estrasburgo, Francia; Dr. AIMÉ PORTE, por su orientación; a COLETTE HINDELANG y GEORGETTE HALLER por la asistencia técnica prestada. Por las sugerencias críticas al Dr. JOHN LYNCH de la Universidad de Nebraska (USA) quien revisó el texto y redactó el resumen en inglés. Al Dr. FERNANDO PALOMINO de la Facultad de Medicina por su gentil colaboración en las fotografías de microscopía óptica. Finalmente al señor ALBERTO PINILLA, estudiante de la carrera de Biología de la Universidad Nacional, quien coleccionó los ejemplares utilizados en el estudio.

BIBLIOGRAFIA

CRUMP, M. L., 1974. Reproductive strategies in tropical anuran Community Misc. Publ. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas, **61:** 1-68.

DAWSON, A. B., 1920. Integument of Necturus maculosus. J. Morph., **34:** 487-580.

DEL PINO, E., 1980. Morphology of the pouch and incubatory integument in marsupial frogs. Copeia, **1:** 10-17.

DOMÍNGUEZ, E., P. NAVAS, J. HIDALGO, J. AIJON, and J. L. LÓPEZ-CAMPOS, 1981. Mucous glands of the skin of *Rana ridibunda*. A histochemical and ultrastructural study. Bas. Appl. Histochem., **25:** 15-22.

DUELLMAN, W. E., 1970. The hylid frogs of Middle America Monog. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas, **1:** 427 pp.

— 1978. The biology of an equatorial herpetofauna in amazonian Ecuador. Mis. Publ. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas, **65:** 1-352.

GIGOT, C. et. A. PORTE, 1971. Sur un aspect particulier d'élaboration d'un produit sécretoire (vésicules a coeur dense) par l'appareil de Golgi dans les jeunes plantules d'orge. C. R. Acad. Sc. París., **272:** 2685-2687.

LE QUANG TRONG, Y., 1971. Étude de la peau et des glandes cutanées de quelques Amphibiens du genre *Phrynobatrachus*. Bull. IFAN, **33:** 988-1025.

MAYOR, H. D., J. C. HAMPTON, B. ROSARIO, 1961. A simple method for removing the resin from epoxy embebed tissue. J. Biophys. Biochem., **9:** 909-910.

MUSHE, E. F., 1909. The cutaneous glands of the common toads. Am J. Anat., **9:** 321-360.

NOBLE, G. A., and E. R., NOBLE, 1944. On the histology of frog skin glads. Trans. Amer. Microsc. Soc., **63:** 254-263.

NOBLE, G. K., 1954. The Biology of the Amphibia. 3 ed. Dover Publ. INC. New York pp. 577.

RIVERO, J. A., 1970. On the origin, endemism and distribution of the genus *Stephania* Rivero (Amphibia, Salientia) with a description of a new species from southeastern Venezuela. Bol. Soc. Ven. Cienc. Nat., **28:** 456-481.

TRUEB, L., 1974. Systematic relathionships of Neotropical horned frogs, genus *Hemiphractus* (Anura: Hylidae). Occas. Pap. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas, **29:** 1-60.